

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|--|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/96, C12Q 1/25, 1/48, 1/68, C12P 21/02 // G01N 33/573 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/02532 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Januar 1998 (22.01.98) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01288 (22) Internationales Anmeldedatum: 16. Juli 1996 (16.07.96) | | (81) Bestimmungsstaaten: JP, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> | |
| (71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): INVITEK GMBH (DE/DE); Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): PETERS, Lars-Erik (DE/DE); Möllendorferstrasse 71, D-10367 Berlin (DE). BENDZKO, Peter (DE/DE); Ifflandstrasse 32, D-12623 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). | | | |
| <p>(54) Titel: METHOD FOR PRODUCING COMPLEX MULTIZYMATICAL, STORAGE RESISTANT REACTION MIXTURES AND USE THEREOF</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG KOMPLEXER MULTIZYMATISCHER LAGERSTABILER REAKTIONSGEMISCHE UND DEREN VERWENDUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention describes a method and its use for producing complex multienzymatical, storage resistant reaction mixtures for synthesising, modifying or analysing polypeptides and optionally nucleic acids characterised in that native or artificial enzymatical, active protein mixtures with reaction buffers, cofactors and substrates are prepared so that they are ready for use and are storage resistant such that only user-specific key components (e.g. mRNS) are missing to start the desired enzymatical reaction(s). In the method a stabiliser is added to the reaction mixtures in the solution which, on the one hand, increases the reacting capacity of the multienzymatical systems and, on the other hand, protects the unstable reaction components from losing their biological activity or their biologically active structure whilst being made storage resistant and during storage. The reaction mixture is made storage resistant by being easily freeze dried under a vacuum and then durably stored at 4-10 °C (refrigerator temperature). Before use the user has to simply reconstitute the ready prepared reaction mixture by adding the original volume of H₂O and start the desired enzymatical reaction(s) by adding the user-specific component(s).</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es wird ein Verfahren und dessen Verwendung beschrieben zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabiler Reaktionsgemische für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden und gegebenenfalls Nukleinsäuren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß a) native oder artificielle enzymatisch aktive Proteingemische mit Reaktionspuffern, Kofaktoren und Substraten anwendungsfertig lagerstabil aufbereitet werden, wobei lediglich anwenderspezifische Schlüsselkomponenten (z.B. mRNS) für den Start der gewünschten enzymatischen Reaktion(en) fehlen, indem den Reaktionsgemischen in Lösung ein Stabilisierungsmittel beigemengt wird, welches einerseits die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Systems erhöht und andererseits die instabilen Reaktionskomponenten vor dem Verlust ihrer biologischen Aktivität bzw. ihrer biologisch aktiven Struktur während der Lagerstabilmachung und Lagerung schützt; b) die Reaktionsgemische durch einfache Gefriertrocknung unter Vakuum lagerstabil gemacht werden und dann bei 4-10 °C (Kühlschranktemperatur) dauerhaft gelagert werden können; c) der Anwender die anwendungsfertigen Reaktionsgemische vor dem Gebrauch lediglich durch die Zugabe des Ursprungsvolumens H₂O rekonstituiert und die gewünschten enzymatischen Reaktion(en) durch die Zugabe des oder der anwenderspezifischen Schlüsselkomponenten startet.</p> | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albania | ES | Spanien | LS | Lettland | SI | Slowenien |
| AM | Annam | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Oesterreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Sengal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Leistung | SZ | S威士忌 |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Ireland | MR | Mauritanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Makau | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Übersee | SG | Singapur | | |
| EK | Eritrea | | | | | | |

Verfahren zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabiler Reaktionsgemische und deren Verwendung

Beschreibung:

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung komplexer multienzymatischer stabilisierter Reaktionsgemische aus nativen und gegebenenfalls artifiziellen enzymatisch aktiven Proteingemischen, die anwendungsfertig komplettiert sind und ohne Aktivitätsverlust bei Kühlzimmertemperatur (0°-10°C) gelagert und transportiert werden können, sowie deren Verwendung für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden und Nukleinsäuren.

Die Verwendung von komplexen Reaktionssystemen aus Zellextrakten oder Enzymgemischen zur Untersuchung biochemischer Reaktionsabläufe spielt eine immer wichtigere Rolle in der modernen Biologie und zunehmend auch in der medizinischen Diagnostik.

Probleme der Synthese, Faltung, der posttranslationalen Reifung und des intrazellulären Targetings von Proteinen werden seit langem mit Hilfe von zellfreien Extrakten oder Lysaten untersucht, die den kompletten ribosomalen Apparat für die Proteinbiosynthese enthalten. Neben Anwendungen aus der Grundlagenforschung gewinnen multienzymatische Reaktionsgemische für die zellfreie Proteinbiosynthese (*in-vitro* Translation) zunehmend Bedeutung für die Lösung präparativ-synthetischer Zielstellungen. Die *in-vitro* Translation wurde außerdem zur Synthese von Proteinteilstücken zur Kartierung von immunodominanten Epitopen, katalytischen Zentren oder Substratbindungstellen eingesetzt. Seit der Einführung des sogenannten Protein-Truncation-Assay (PTU) zur Detektion von relevanten Genmutationen besteht ein wachsender Bedarf in der Tumordiagnostik an einfach zu handhabenen,

standardisierten und anwendungsfertigen Reaktionsgemischen für die *in-vitro* Translation von synthetischer, über RT-PCR hergestellte, mRNAs.

Auch bei anderen analytisch-molekularbiologischen Methoden, wie der Polymerasekettenreaktion (PCR), der DNS-Sequenzierung und *in-vitro* RNS-Synthese (*in-vitro* Transkription) zeichnet sich ein Trend ab, klassische Einzelenzymassays durch multienzymatische Reaktionssysteme zu ersetzen. Die Kombination von mehreren Enzymen und Kofaktoren mit spezialisierten Funktionen erhöht die Prozessivität und verringert die Mutationsrate von DNS- und RNS-Polymerasen *in-vitro*. Im Ergebnis können wesentlich längere DNS-Fragmente (>10 kb) amplifiziert werden als mit nur einem Enzym. Die Synthesegenauigkeit und Produktausbeute sind höher, die Fehlsynthese unspezifischer Nebenprodukte wird besser unterdrückt. Zu den Enzymen und Proteinfaktoren, die in der PCR als multienzymatisches Reaktionssystem kombiniert werden, gehören inorganische Pyrophosphatase, DNS-Bindungsproteine, Polymerase-spezifische Antikörper und DNA Polymerasen mit verschiedenen Exonukleaseaktivitäten.

Beim gegenwärtigen Stand der Technik ist die Anwendung multienzymatischer Reaktionsgemische mit einer Reihe von Nachteilen bezüglich Handhabung, Reproduzierbarkeit und Lagerstabilität verbunden, welche die Nutzung von multienzymatischen Reaktionsgemischen für die Protein- und DNS-Synthese in der angewandten Forschung und Diagnostik verzögern.

Der entscheidende Nachteil von multienzymatischen Reaktionssystemen gegenüber Einzelenzymassays besteht in der komplizierten Handhabung und der eingeschränkten bzw. nicht vorhandenen Lagerstabilität. Komplette Reaktionsgemische mit allen Enzymen, Substraten und Kofaktoren sind als wässrige Lösungen weder bei Raumtemperatur noch im gefrorenen Zustand

über längere Zeit stabil. Das ergibt sich aus der Tatsache, daß die Bedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, Konzentrationen der Enzyme und des Stabilisierungsmittels, Art der Salze), die optimal für die Durchführung der biochemischen Reaktion sind, von denen abweichen, die für die Konservierung und dauerhafte Stabilisierung der Enzymkomponenten und Kofaktoren notwendig sind (Franks, F. (1989) Process Biochem. 24 (1), R3-R7).

Bei multienzymatischen Reaktionsgemischen kommt das Problem hinzu, daß die einzelnen Komponenten der Zellextrakte oder Enzymgemische, je nachdem, ob es sich um lösliche Enzyme, fibrilläre Strukturproteine, membranassoziierte Enzymkomplexe oder Nukleoproteine handelt, unterschiedliche Anforderungen an das Stabilisierungsmedium und die Lagerbedingungen stellen. In den meisten Fällen lassen sich die verschiedenen Anforderungen nicht miteinander vereinbaren. Deshalb werden kommerzielle Reaktionssysteme für die in-vitro Translation, Transkription, PCR oder DNS-Sequenzierung in Form von Kits angeboten, in denen die Komponenten einzeln bereitgestellt werden. Wie das folgende Beispiel eines Reaktionsgemisches für die in-vitro Translation zeigt, müssen die verschiedenen Komponenten des Kits getrennt bei unterschiedlichen Bedingungen gelagert werden.

| Komponenten Reaktionsgemisches | des Konzentrationsf- aktor | Lagertemperatur |
|--|----------------------------------|-----------------|
| 1. Mastermix (HEPES-KOH, ATP, GTP, DTT, tRNS, Speridin, Kreatinphosphat) | 12.5X | -20°C |
| 2. Aminosäuremix (2.5 mM von jeder Aminosäure) | 50X | -20°C |
| 3. Kreatinkinase | 25X | 4°C |
| 4. RNase Inhibitor | ----- | -20°C |
| 5. Zellextrakt/lysat | 3X | -80°C |

| | | |
|---|---------|-------|
| (zellfreies Extrakt, K-Azetat, Mg-Azetat, HEPES-KOH, DTT) | | |
| 6. Translationspuffer (K-Azetat/Mg-Azetat) | (K- 25X | -20°C |

Dem Anwender obliegt es, jedesmal vor Versuchsbeginn den Reaktionsansatz aus den Einzelkomponenten zusammenzumischen. Dieser Arbeitsschritt ist fehleranfällig und lässt sich schwer automatisieren. Der Zeitaufwand potenziert sich mit der Anzahl der parallelen Reaktionen. Unter diesen Voraussetzungen nimmt die Versuchsvorbereitung oft mehr Zeit in Anspruch als die eigentliche Versuchsdurchführung.

Aufgrund der verschiedenen Temperaturanforderungen (4°C, -20°C und -80°C) ist der technische Aufwand für die Lagerung und Transport der Ausgangskomponenten entsprechend hoch. Die Versendung eines Kits für die *in-vitro* Translation muß in Trockeneis erfolgen, um ein Auftauen des Zellextraktes zu vermeiden.

Die empfindlichste und zugleich wichtigste Komponente von *in-vitro* Translationsassays ist das Zellextrakt mit den makromolekularen Nukleoproteinkomplexen für die ribosomale Proteinsynthese. Der komplexe biochemische Reaktionsablauf der RNS-gesteuerten Proteinsynthese erfordert die kooperative Wechselwirkung einer Vielzahl von Enzymen, Enzymkomplexen und Strukturproteinen mit unterschiedlicher Struktur und Stabilität. Anders als in den Zellen, wo die makromolaren Proteinkomplexe des ribosomalen Translationsapparates über die Interaktion mit den Filamenten des Zytoskellettes stabilisiert werden, enthalten die zellfreien Extrakte und Lysate kein intaktes Zytoskelett mehr. Frei in Lösung dissoziieren die makromolekularen Komplexe leicht und verlieren dadurch ihre Reaktionsfähigkeit.

Bisher ist die einzige zuverlässige Methode für die Konservierung von löslichen biologisch aktiven Zellextrakten die Lagerung im tiefgefrorenen Zustand bei -80°/-120°C. Damit sind eine Reihe von Problemen und Nachteilen verbunden. Beim Einfrieren verlieren Zellextrakte bzw. Lysate aus Weizenkeimen, Retikulozyten oder Bakterienzellen einen Teil ihrer ursprünglichen enzymatischen Aktivität, da durch die Bildung von Wasserkristallen viele Proteine irreversibel geschädigt werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen für nachfolgende Versuche führt bei zellfreien Lysaten aus *E. coli* und Retikulozyten zum fast vollständigen Verlust der Translationaktivität. Bei Weizenkeimextrakten beträgt der Aktivitätsverlust etwa 20-40% nach jedem Auftauen und Einfrieren.

Die Instabilität von zellfreien Extrakten gegenüber wiederholtem Einfrieren und Auftauen zwingt den Anwender zu einem unwirtschaftlichen Verbrauch. Um reproduzierbare Versuchsergebnisse zu erzielen, darf jede Charge des translationsaktiven Zellextraktes nur einmal aufgetaut werden. Eine denkbare Alternative wäre die Lagerung kompletter anwendungsfertig zusammengestellter Reaktionsgemische im tiefgefrorenem Zustand bei -80°C. Tests mit Translationsassays auf der Basis von Weizenkeimextrakten zeigten, daß bereits ein einmaliges Einfrieren und einwöchige Lagerung bei -80°C zu einem Verlust von 60% der Translationsaktivität im Vergleich zur frisch angestzten Kontrollreaktion führt.

Konzentrierte zellfreie Proteinextrakte sind somit verhältnismäßig lagerstabil bei Tiefsttemperaturen, Reaktionsgemische mit entsprechend verdünnten Zellextrakten sind es nicht. Ein entscheidender Faktor dafür ist die hohe

Proteinkonzentration in unverdünnten Zellextrakten, die stabilisierend wirkt.

Ähnlich verhält sich die Stabilitätsproblematik bei Reaktionsgemischen für die PCR, *in-vitro* Transkription und DNS-Sequenzierung. Das Einfrieren selbst in konzentrierten wäßrigen Lösungen deaktiviert DNS- und RNS-Polymerasen vollständig, so daß diese nur in Gegenwart hochkonzentrierter Kryoprotektoren lagerstabil bei -20°C sind. Das üblicherweise als Kryoprotector verwendete Glycerin (50%) und andere (DMSO, Polyethylenglycol) beeinträchtigen in hohen Konzentrationen die PCR (Primer-Annealing) und *in-vitro* Transkription (Crowe, L. M. and J. H. Crowe, Dev. Biol. Stand. 74, 285-294)). Bei Glycerinkonzentrationen <50% sinkt die Lagerstabilität der Enzyme bei -20°C.

Seit dem Erscheinen der ersten Veröffentlichungen die Präparation zellfreier Extrakte für die *in-vitro* Translation Mitte der 70-iger Jahre hat sich wenig an der Methode zur Herstellung und stabilen Lagerung geändert. Eine Alternative zum beschriebenen Stand der Technik wäre die Lagerstabilmachung durch Gefriertrocknung. Diese Methode wurde erfolgreich zur Stabilisierung von Liposomen und Membranfraktionen, Einzelenzympräparaten oder von Teilreaktionsgemischen ohne Enzymkomponente angewendet, wobei spezielle Zucker oder Polyole in Kombination mit bivalenten Metallionen oder Tensiden die Denaturierung der Biomoleküle durch Wasserverlust verhinderten bzw. einschränkten.

Als besonders geeignet für die Lagerstabilmachung von Enzympräparaten erwies sich der Zucker Trehalose in Kombination mit bekannten Kryoprotektoren wie PEG oder DMSO (19, 9, 10). Dieser Zucker ist ein natürliches Stoffwechselprodukt vieler Pflanzen, Insekten und Mikroorganismen, das unter bestimmten Stressbedingungen (Hitzeschock, Dehydrierung, radioaktive

Strahlung) intrazellulär angereichert wird und das Überleben dieser Organismen sichert.

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem ist die Bereitstellung eines Herstellungsverfahrens, das die Nachteile des Standes der Technik bezüglich der Reaktionsfähigkeit, Lagerstabilität, des Transportes sowie der anwendungsfertigen Aufbereitung von komplexen multi-enzymatischen Reaktionsgemischen für die Durchführung biochemischer Reaktionsabläufe vermeidet. Insbesondere soll das Verfahren zu Produkten führen, bei denen auf eine Tiefkühlung der zu lagernden und zu transportierenden Reaktionsgemische verzichtet werden kann, sowie durch die Bereitstellung anwendungsfertiger, d.h. mit allen Reaktionskomponenten versehenden, Reaktionsgemische den experimentellen Aufwand für den Anwender erheblich reduzieren und die Reproduzierbarkeit erhöhen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Ansprüche 1 und 9 gelöst. Die Unteransprüche betreffen spezielle Ausführungsformen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist gekennzeichnet dadurch, daß native oder artifizielle enzymatisch aktive Proteingemische mit den Reaktionskomponenten und einem Stabilisierungsmittel, welches einerseits die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Systems erhöht und welches andererseits die instabilen Reaktionskomponenten vor dem Verlust ihrer biologischen Aktivität bzw. ihrer biologisch aktiven Struktur während der Lagerstabilmachung und Lagerung schützt, in wässriger Lösung kombiniert werden. Aanschließend werden sie durch Gefriertrocknung in einen bei 0°-10°C lagerstabilen Zustand überführt, wobei die Menge des Stabilisierungsmittels,

die zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität des Reaktionsgemisches führt, equivalent zu der Menge ist, die für die Lagerstabilmachung des komplexen multienzymatischen Reaktionsgemisches benötigt wird.

Als native enzymatisch aktive Proteingemische Zelleextrakte, Zellysate oder Fraktionen aus diesen eingesetzt.

Als artifizielle enzymatisch aktive Proteingemische wird eine Kombination aus vorgereinigten Einzelenzymen, Cofaktoren und gegebenenfalls Strukturproteinen eingesetzt, die gegebenenfalls verschiedener Herkunft sind.

Reaktionskomponenten gemäß der Erfindung sind enzymatische und nichtenzymatische Kofaktoren, Enzymsubstrate, Nukleotide und Nukleoside oder deren Oligomere, Proteine, Peptide, Thiolverbindungen, RNS, DNS und gegebenenfalls Derivate jeder der obigen Substanzen einzeln oder in Kombination.

Als Stabilisierungsmittel wird vorzugsweise ein Zucker verwendet, der bei einer Konzentration von 8-12% (M/Vol) in wässriger Lösung im anwendungsfertigen Reaktionsgemisch optimale Bedingungen für die Stabilisierung der labilen Reaktionskomponenten erzeugt und außerdem die maximale spezifische Produktausbeute der multienzymatischen Reaktionsgemische während der Synthese gewährleistet, vorzugsweise handelt es sich um Trehalose.

Gegebenenfalls wird eine Vakuumtrocknung der multienzymatischen Reaktionsgemische bei Raumtemperatur in einer handelsüblichen Lyophilisationsanlage in einer Zeitspanne von 3-4 Stunden durchgeführt, wobei die Reaktionsgemische gegebenenfalls unmittelbar vor der Vakuumtrocknung in flüssigem Stickstoff

oder gegebenfalls in einem Trockeneis/Alkoholbad eingefroren werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren betrifft bevorzugt multienzymatische Reaktionsgemische für die in-vitro Translation in Weizenkeimextrakten und PCR. 50 μ l-Reaktionsgemische wurden nach dem erfindungsgemäßen Vefahren (Ausführungsbeispiel 1) angesetzt und gefriergetrocknet. Nach verschiedenen Lagerfristen wurden die getrockneten Reaktionsgemische in Wasser unter Zugabe der entsprechenden mRNA und gegebenfalls einer radioaktiv markierten Aminosäure rekonstituiert. Die Reaktionsfähigkeit der so behandelten und gelagerten Reaktionsgemische wurde mittels Translation verschiedener mRNAs nachgewiesen: Dehydofolatreduktase (DHFR, 17.5 kD) und Obelin (20 kD). Der quantitative Nachweis des Translationsproduktes erfolgte über die Messung des TCA-gefällten radioaktiv markierten Proteins aus 5 μ l des Reaktionsansatzes, oder durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität der DHFR in 10 μ l des Reaktionsansatzes nach 2 Stunden Inkubation bei 25°C. Der qualitative Nachweis des Translationsproduktes erfolgte mittels Gelelektrophorese im SDS-PAGE und anschließender Radioautographie. Die Translationsausbeute in den rekonstituierten gefriergetrockneten Reaktionsgemischen wurde mit jeweils mit der Produktausbeute in unbehandelten Reaktionsansätzen mit und ohne Trehalose verglichen, um die Effektivität der Lagerstabilmachung zu bestimmen. Die Translationaktivität der rekonstituierten Reaktionsgemische nach 1-3 Monate Lagerung bei 4°C schwankte zwischen 92-100% im Vergleich zur Aktivität in den unbefriedigten Kontrollreaktion mit 10% Trehalose (Abb. 6).

Die Reaktionsfähigkeit rekonstituierter gefriergetrockneter PCR-Reaktionsgemische mit einem artifiziellen Enzymgemisch wurde in einem RAPD-PCR-Assay überprüft. Das artifizielle Enzymgemisch für die PCR bestand aus der Tag-DNS-Polymerase, der Deep-Vent®-DNS-Polymerase und der inorganischen *Tth*-Pyrophosphatase im Mischungsverhältnis 10:1:0,2 (Einheiten).

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht so die anwendungsfertige Aufbereitung von nativen und artifiziellen enzymatisch aktiven Proteingemischen mit Reaktionspuffern, Kofaktoren und Substraten in dem :

- den Reaktionsgemischen in wäßriger Lösung ein Stabilisierungsmittel zugeführt wird, welches einerseits die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Systems verbessert und andererseits die labilen Reaktionskomponenten vor dem Verlust ihrer Aktivität bzw. ihr biologisch aktiven Struktur während der Lagerstabilmachung schützt,
- diese nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff vakuumgetrocknet werden,
- ggf. eine Überschichtung mit inertem Gas erfolgt.

Die so erhaltenen lagerstablen Reaktionsgemische werden erfindungsgemäß nach Rekonstituierung in Wasser (Milli-Q-Qualität) durch Zuführung von anwenderspezifischen Schlüsselkomponenten je nach gewünschter enzymatischer Reaktion für die Synthese, Modifikation oder Ananalyse von Proteinen, Polypeptiden oder Nukleinsäuren verwendet.

Die erfindungsgemäß hergestellten Reaktionsgemische haben den Vorteil, daß sie bei 0°-10°C stabil gelagert und transportiert werden können. Dadurch entfällt der technisch hohe Aufwand für Anschaffung und Unterhaltung einer Tiefkühlwanlage, wie sie nach herkömmlichen Stand der Technik notwendig ist. Ein zweiter

Vorteil besteht darin, daß die Reaktionsgemische anwendungsfertig mit allen notwendigen Komponenten aufbereitet sind, so daß der Anwender die gewünschte Reaktion nur durch die Zugabe einer, oder maximal zweier Schlüsselkomponenten starten kann. Das hebt die Nachteile des Standes der Technik auf bezüglich:

- der simultanen Durchführung einer großen Zahl von Parallelversuchen (Epitopkartierung),
- der Reproduzierbarkeit von parallelen und aufeinanderfolgenden Enzymreaktionen
- des minimalen Zeitaufwandes für die Versuchsvorbereitung,
- der Fehleranfälligkeit des Vorbereitens komplexer Reaktionsgemische
- der Automatisierung komplexer biochemischer Reaktionsabläufe im analytischen Maßstab.

Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, daß Trehalose neben seiner bekannten Schutzwirkung bei Dehydrierung die spezifische Produktausbeute in der *in-vitro* Translation mit Weizenkeimextrakten und PCR erhöht. In unbehandelten, d.h. frisch angesetzten, Translationsreaktionen steigt die spezifische Produktausbeute (synthetisiertes Protein pro eingesetzte mRNA) im Vergleich zu Reaktionsansätzen ohne Trehalose in Abhängigkeit von der Trehalosekonzentration. Die maximale Produktausbeute wird bei 10% w/v erzielt (Abb. 1).

Der 'Enhancer'-Effekt der Trehalose in wässriger Lösung konnte für eine Reihe von Modellproteinen und verschiedenen Weizenkeimextrakten validiert werden (Abb. 2a und 2b), so daß es sich um ein produktunabhängiges universielles Phänomen handelt.

Die neu entdeckte Wirkung ist eine unikale Eigenschaft der Trehalose. Alle anderen untersuchten Hilfsstoffe, die nach dem Stand der Technik ebenso wie Trehalose als effektive Kryoprotktoren bzw. Stabilisatoren für die Vakuumtrocknung verwendet werden, inhibieren die *in-vitro* Translation im Konzentrationsbereich, der für die Lagerstabilmachung notwendig ist (Abb. 3).

Es stellte sich außerdem heraus, daß die optimale Trehalosekonzentration für die Lagerstabilmachung durch Gefriertrocknung dem Konzentrationsoptimum in der Translationsreaktion in wässriger Lösung entspricht (Abb. 4).

Auch in PCR-Anwendungen wurde ein 'Enhancer'-Effekt der Trehalose entdeckt. Ähnlich wie bei der *in.vitro* Translation erhöht sich die Ausbeute des (der) spezifischen Amplifikate mit steigender Trehalosekonzentration, während die Amplifikation unspezifischer DNS-Fragmente unterdrückt wird (Abb. 5a/5b).

Besonders drastisch ist der Trehalose-Effekt in wässriger Lösung bei der Amplifikation von DNS-Fragmenten > 10kb in Tris-HCl-Reaktionspuffern, wo ohne Trehalose kein spezifisches Produkt amplifiziert wird (Abb. 5c).

Demnach unterscheidet sich die vorliegende Erfindung vom Stand der Technik zur Verwendung von Trehalose als Stabilisator in zwei wesentlichen Punkten. Erstens, können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren überraschend komplette, multienzymatische und anwendungsfertige Reaktionsgemische mit mehreren labilen Proteinkomponenten und nicht Einzelenzyme bzw. Teilreaktionsgemische ohne Enzym lagerstabil und ohne Aktivitätsverlust hergestellt werden. Zweitens, sind unter

Anwendung des neu entdeckten 'Enhancer'-Effektes der Trehalose die Bedingungen im erfindungsgemäßen Verfahren so optimiert, daß Trehalose als einziger Hilfsstoff eine ausreichende (Langzeit-) Lagerstabilität gewährleistet und gleichzeitig die Aktivität der rekonstituierten multienzymatischen Reaktionsgemische erhöht. Im Ergebnis der Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Reaktionsfähigkeit rekonstituierter Reaktionsgemische höher als bei bei unbehandelten, 'frischen' Reaktionsansätzen ohne Stabilisator. Drittens, die lyophilisierten Reaktionsgemische sind im Gegensatz zu bekannten Verfahren nur im Temperaturbereich zwischen 0°-10°C lagerstabil für mindestens 6 Monate ohne Aktivitätsverlust. Eine Lagerung bei Temperaturen >15°C und <0°C führt zum vollständigen Aktivitätsverlust innerhalb 1 Monats.

Die Erfindung soll nachstehend an zwei Beispielen erläutert werden.

1. Ausführungsbeispiel:

Herstellung eines lagerstabilen . translationsaktiven Reaktionsgemisches auf der Basis von Weizenkeimextrakt unter Verwendung des Stabilisators Trehalose

a) **Herstellung des anwendungsfertigen Reaktionsgemisches aus den Einzelkomponenten**

Das Reaktionsgemisch wird auf Eis (0°-4°C) in einem sterilen 2.0ml-Mikrozentrifugengefäß (Schraubdeckel mit Gummidichtung und flacher Boden sind wichtig !) aus folgenden Einzelkomponenten zusammenpipettiert:

| Reihenfolge | Komponenten und Zusammensetzung | Volumina |
|-------------|--|----------|
| 1. | MilliQ-H ₂ O | 13 µl |
| 2. | Aminosäuremix (2.5 mM von jeder der 20 Aminosäuren) | 2 µl |
| 3. | Mastermix (312 mM HEPES-KOH pH 7.6, 12.5mM ATP, 1.25mM GTP, 100mM Kreatinphosphat, 625µg/ml yeast tRNA, 3.125mM Spermidin, 25mM DTT) | 4 µl |
| 4. | Kreatinphosphokinase 1.4 mg/ml | 2 µl |
| 5. | 1M Kalium-Aacetat | 2µl |
| 6. | 25mM Mg-Aacetat | 1µl |
| 7. | 50% Trehalose | 10 µl |
| 8. | Weizenkeimextrakt (90-100 OD ₂₆₀) | 16 µl |

Die Komponenten im Reaktionsgefäß vorsichtig durchmischen (nicht vortexen). Das Volumen des fertigen Reaktionsansatzes vor der Lagerstabilmachung beträgt 50 µl. Für 25- oder 100µl-Ansätze müssen die Volumina der Einzelkomponenten proportional geändert werden.

b) Lagerstabilmachung der Translationsgemische durch Gefriertrocknung (Lyophilisation)

Die offenen 2.0 ml Reaktionsgefäße mit den Translationsgemischen werden unmittelbar nach der Durchmischung in flüssigen Stickstoff schockgefroren (-120°C) und für 5 Minuten im flüssigen Stickstoff inkubiert. Danach werden die gefrorenen Reaktionsgemische so schnell wie möglich in eine Lyophilisationskammer überführt, die an eine handelsübliche Vakuum-Ölpumpe angeschlossen ist. Die Vakuumpumpe muß bereits

30-60 Minuten Vorlauf haben, damit sofort nach Öffnen des Ventils ein starkes Vakuum im der Lyophilisationskammer aufgebaut wird. Im Labor der Erfinder wurde eine Lyophilisationsanlage von Heto-Lab benutzt. Die Reaktionsgemische werden 3-4 Stunden bei Raumtemperatur (20-30°C) lyophilisiert. Nach Beendigung der Lyophilisation wird die Vakuumkammer vorsichtig mit der Umgebungsluft oder gegebenenfalls mit einem inerten Gas belüftet. Der Lufteinlaß ist mit einem Sterilfilter zu versehen, um eine mikrobielle Kontamination der lyophilisierten Reaktionsgemische zu verhindern. Danach werden die Reaktionsgefäße unter sterilen Bedingungen luftdicht mit den Schraubdeckeln verschlossen und zusätzlich mit Parafilm versiegelt. Gegebenenfalls können als Gefäße für die Gefriertrocknung auch Glasampullen verwendet werden, die dann entsprechend zugeschmolzen werden.

In diesem Zustand werden die lyophilisierten Reaktionsgemische lichtgeschützt im Kühlschrank bei 0-4°C gelagert.

c) Rekonstituierung und *in-vitro* Translation

Die lyophilisierten Reaktionsgemische werden auf Eis gestellt und in 48 µl Milli-Q-H₂O aufgelöst. Die getrockneten Rückstände lösen sich sofort in Wasser auf. Danach erfolgt die Zufgabe von 2 µl mRNS-Lösung (0.5-2µg/µl). Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wird der Reaktionsansatz durchmischt. Der rekonstituierte Reaktionsansatz wird für die *in-vitro* Translation für 2-3 Stunden bei 25°C inkubiert. Im Falle einer radioaktiven Markierung des Translationproduktes mit L-¹⁴C-Leucin (oder ³⁵S-Methionin) erfolgt die Rekonstituierung in 44µl Milli-Q-H₂O, 2 µl mRNA und 4µl Leucin-Lösung. Nach der angegebenen Inkubationszeit wird die Menge des Translationproduktes in 5 bzw. 10µl des Reaktionsansatzes bestimmt. Die Bestimmung erfolgt entweder enzymatisch (DHFR-Enzymaktivität) oder über die Messung der säurefällbaren

Radioaktivität (in cpm) im Scintillationsmeßgerät nach Standardprozeduren.

2. Ausführungsbeispiel:

Herstellung eines lagerstabilen Reaktionsgemisches für Long-Range und RAPD-PCR auf der Basis eines Enzymmixes aus Taq-DNA-Polymerase, Pfu-DNA-Polymerase und inorganischer Pyrophosphatase von *Thermus thermophilus*

a) Herstellung des anwendungsfertigen Reaktionsgemisches aus den Einzelkomponenten

Das Reaktionsgemisch wird auf Eis (0°-4°C) in einem sterilen 0.5 ml-passend für den entsprechenden Thermocycler) aus folgenden Einzelkomponenten zusammenpipettiert:

| Reihenfolge | Komponenten und Zusammensetzung | Volumina |
|-------------|---|----------|
| 1. | MilliQ-H ₂ O | 30 µl |
| 2. | 10X Reaktionspuffer (500mM Tricine-KOH pH 9.2, 160mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1% Tween 20) | 5µl |
| 3. | 50X dNTP-Mix (12.5mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP) | 1 µl |
| 4. | 50 mM MgCl ₂ | 1.5 µl |
| 5. | Forward Primer (10 pmol/µl) | 1µl |
| 6. | Reverse Primer (10 pmol/µl) | 1µl |
| 7. | 50% Trehalose | 10 µl |
| 8. | Gelatine (20mg/ml) | 0.5 µl |

Die Komponenten im Reaktionsgefäß durchmischen und abzentrifugieren. Das Volumen des fertigen Reaktionsansatzes

vor der Lagerstabilmachung beträgt 50 µl. Die Schlüsselkomponente für den Start der PCR ist die entsprechende Template-DNS. Für 25- oder 100µl-Ansätze müssen die Volumina der Einzelkomponenten proportional geändert werden.

b) Lagerstabilmachung der PCR-Gemische durch Gefriertrocknung (Lyophilisation)

Entsprechend Ausführungsbeispiel 1b).

c) Rekonstituierung und PCR

Die lyophilisierten Reaktionsgemische werden auf Eis gestellt und in 48 µl Milli-Q-H₂O aufgelöst. Die getrockneten Rückstände lösen sich sofort in Wasser auf. Danach erfolgt die Zufgabe von 2 µl Template-DNS-Lösung (5-50ng/µl). Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wird der Reaktionsansatz durchmischt. Der rekonstituierte Reaktionsansatz wird direkt vom Eisbad auf ein vorgeheizten Thermocycler (94°C) überführt. Es folgt ein 2-4 minütiger DenaturierungsSchritt, dann wird je nach Anwendung eines der beiden PCR-Programme gestartet:

RAPD-PCR: 94°C 20 sek. Long-Range PCR: 94°C

10 Sek.

37°C 30 Sek.

65°C 20 Sek.

72°C 60 Sek.

68°C 10 Min.

35 Zyklen

25 Zyklen

1. Jeweils 10µl des Reaktionsgemisches werden nach Beendigung des Programmes auf 0.8% TAE-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch analysiert.

Legende zu den Abbildungen

Abbildung 1. DHFR-Syntheseausbeute in unbehandelten Reaktionsgemischen bei verschiedenen Trehalosekonzentrationen zum Zeitpunkt der maximalen Produktakkumulation (2 h), getestet mit verschiedenen Weizenkeimextrakten.

a) Auf der Basis von hochaktivem Weizenkeimextrakt (Lysat SL, weiße Balken) und zellfreiem Extrakt aus weniger aktiven Weizenkeimen (Lysat JB, schwarze Balken) wurden 2 Serien von DHFR-Translationsreaktionen (50 μ l, 2 μ g DHFR-mRNA) angesetzt mit steigenden Trehalosekonzentrationen. Nach 2 Stunden Synthesedauer der in-vitro Translation bei 25°C wurde die maximale Produktkonzentration im Reaktionansatz erreicht (siehe Translationskinetiken in Abb. 6a). Die Produktausbeute (DHFR-Aktivität) steigt mit wachsender Trehalosekonzentration und erreicht bei 10% (M/Vol) sein Maximum. Für beide Weizenkeimextrakte liegt die optimale Trehalosekonzentration bei 10% trotz verschiedener Translationsaktivität. Beim schwächer aktiven Lysat fällt eine Verschiebung der Konzentrationsabhängigkeit zugunsten höherer Trehalosekonzentrationen (12,5% und 15%) auf.

Abbildung 2a. 'Enhancer'-Effekt der Trehalose bei der in-vitro Translation verschiedener mRNA's in unbehandelten Reaktionsgemischen.

Bestimmung der Produktausbeute (säurefallbare Radioaktivität) in 50 μ l-Translationsreaktionen mit 3 ausgewählten mRNA's mit und ohne Trehalosezusatz. Zur radioaktiven Markierung des Translationsproduktes wurden pro Reaktion jeweils 1 μ l [³⁵S]-Methionin (15 pmol = 349.440 cpm) eingesetzt. Zu Messung des säurefallbaren markierten Translationproduktes wurden nach 2

Stunden dem Reaktionsgemisch 2 μ l entnommen. Folgende Modellproteine wurden untersucht:

- humanes Calcitonin (120 bp, 0.25 μ g),
- Obelin (700 bp, 0.25 μ g),
- *E.coli* DHFR (500 bp, 0.25 μ g).

Die Translationsreaktionen mit [³⁵S]-Methionin-Markierung wurden bei einer unterkritischen RNA-Konzentration durchgeführt. Bei höheren RNA-Konzentrationen erreichte die Synthese bereits nach 15 Minuten Inkubation ihren Sättigungspunkt aufgrund der limitierenden Methioninkonzentration im Reaktionsansatz.

Abbildung 2b. Demonstration des positiven Trehaloseeffektes in unbehandelten radioaktiven Translationsassays mit [¹⁴C]-Leucin-Markierung verschiedener Modellproteine.

Vergleich der Produktausbeute (säurefällbare Radioaktivität) in 50 μ l-Translationsreaktionen mit und ohne Trehalose. Zur radioaktiven Markierung des Translationsproduktes wurden pro Reaktion jeweils 4 μ l [¹⁴C]-Leucin (624 pmol = 349.440 cpm) eingesetzt. Zu Messung des säurefallbaren markierten Translationproduktes wurden nach 3 Stunden dem Reaktionsgemisch 5 μ l entnommen. Folgende Modellproteine wurden verglichen: humaner Elongationsfaktor 2 (hEF 2, 300 bp, 2.0 μ g RNA), ein Oligomerkonstrukt des antibakteriellen Peptids Cecropin A (Cecropin A-7-mer, 2.5 μ g RNA), Obelin (700 bp, 2.0 μ g RNA), *E.coli* DHFR (500 bp, 1.5 μ g RNA).

Abbildung 3. Vergleich der Wirkung bekannter Stabilisatoren auf die DHFR in-vitro Translation in unbehandelten und rekonstituierten gefriergetrockneten Reaktionsgemischen.

Zwei Serien von DHFR-Translationsreaktionen wurden unter Standardbedingungen (50 μ l, 2 μ g DHFR-mRNA, 2 h, 25°C)

20

durchgeführt mit jeweils 10% m/vol Enkonzentration der ausgewählten Zucker. Die erste Serie (weiße Balken) von Translationsreaktionen bestand aus unbehandelten Reaktionsgemischen, die unmittelbar vor dem Start der *in-vitro* Synthese aus den Einzelkomponenten zusammengemixt wurden. Für die zweite Versuchsserie (schwarze Balken) wurden komplett Reaktionsgemische hergestellt, die zunächst gefriergetrocknet wurden und dann für die Synthese in 48µl Bidest Wasser rekonstituiert wurden. Zur Kontrolle für den Vergleich der Translationsausbeuten (DHFR-Aktivität) wurde eine DHFR-Translationsreaktion in einem Standardreaktionsgemisch ohne Zuckerzusatz durchgeführt. Die DHFR-Aktivität wurde aus jeweils 10µl eines Reaktionssatzes bestimmt.

Abbildung 4. Vergleich der DHFR-Synthesearausbeute in rekonstituierten Translationsreaktionsgemischen mit verschieden Trehalosekonzentrationen. Bestimmung der optimalen Trehalosekonzentration für die Lagerstabilmachung.

Nach 3 Stunden Synthesedauer bei 25°C wurde die maximale Menge des säurefällbaren radioaktiv-markierten Translationsproduktes erreicht (siehe Translationskinetiken in Abb. 3). Wie bei dem vorangegangenen Experiment konnte die höchste Produktausbeute bei 10% (M/Vol) Trehalose erreicht. Eine höhere Konzentration (15%) inhibiert die Translation. Die Reduktion der Translationsausbeute bei Trehalosekonzentrationen <10% im Vergleich zur Kontrollreaktion (unbehandeltes Translationsgemisch ohne Trehalose, nicht gefriergetrocknet) ist eher auf die ungenügende Stabilisierung des translationsaktiven Weizenkeimlysats während der Gefriertrocknung zurückzuführen.

Abbildung 5a: Einfluß der Trehalose auf die Performance von RAPD-PCR-Assays

RAPD-PCR mit einem 10-mer Zufallsprimer und Insekten-DNA in unbehandelten Reaktionsgemischen mit verschiedenen Trehalosekonzentrationen. Die RAPD PCR wurde unter Standardbedingungen mit 250 ng genomicscher DNA aus *Aeshna cynea* durchgeführt. Die Zugabe von Trehalose reduziert den unspezifischen Hintergrund, erzeugt durch Falschamplifikate, und verstärkt mit zunehmender Konzentration die Amplifikation der längeren polymorphen DNA-Fragmente (> 2kb).

Spur 1: RAPD-PCR im Standard-PCR-Puffer [50mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C)-50mM KCl-0.1% Triton 100].

Spur 2: RAPD-PCR im Tris--PCR-Puffer II [50mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C)-16mM (NH₄)₂SO₄-0.01% Tween 20].

Spur 3-5: RAPD-PCR im Tris-PCR-Puffer II angereichert mit 2.5%, 5%, und 10% v/w Trehalose.

Spur 6: DNA 1 Kb Ladder.

Abbildung 5b: Trehaloseeffekt in unbehandelten PCR-Reaktionsgemischen

Amplification eines 98 bp Fragmentes aus dem Cyctischen Fibrosisgene unter Standardbedingungen. Die Zugabe von Trehalose in unbehandelte Reaktionsansätze reduziert konzentrationsabhängig den unspezifischen Hintergrund (falsche Amplifikate bis 2kb).

Spur 1: DNA 1 Kb Ladder.

Spur 2: PCR im Standardreaktionsgmisch ohne Trehalose.

Spur 3: PCR in der Gegenwart von 5% Trehalose,

Spur 4: PCR in der Gegenwart von 10% Trehalose.

Abbildung 5c: Effekt der Trehalose auf die Long-Range-PCR in Tris-HCl-Reaktionspuffern.

Long Range-PCR von einem 20 kb 1DNA-Fragment in unbehandelten Reaktionsgemischen mit verschiedenen Tris-HCl Reaktionspuffern mit und ohne Trehalose unter Verwendung eines artifiziellen Enzymgemisches (Taq-DNA-Polymerase, Pfu-DNA-Polymerase, inorg. Pyrophosphatase). Die Zugabe von 10% w/v Trehalose ist notwendige und hinreichende Bedingung für die Amplifizierung

des spezifischen DNA-Fragmentes unter den beschriebenen Bedingungen.

Spur 1: LR-PCR im Standard-PCR-Puffer(Tris-HCl/KCl/Triton X100 pH 8.3).

Spur 2: LR-PCR in Tris-HCl/(NH₄)₂SO₄/Tween 20 (pH 8.8).

Spuren 3-5: LR-PCR in kommerziellen Tris-HCl-Reaktionspuffern.

Spur 6: High molecular weight DNA-Marker 9-48 kb (GIBCO BRL).

Spuren 7-11: Die gleichen Reaktionsansätze wie in Spur 1-5, aber mit 10% Trehalose.

Spur 12: DNA 1Kb Ladder (GIBCO BRL).

Abbildung 6. Versuche zur Langzeitstabilität von gefriergetrockneten Translationsassays.

50µl-Translationsreaktionsgemische, komplett mit allen Komponenten bis auf die DHFR-mRNA wurden nach den bekannten Bedingungen gefriergetrocknet und lichtgeschützt bei zwei verschiedenen Temperaturen gelagert. Nach verschiedenen Zeitabständen wurden Translationsreaktionen unter den Standardbedingungen durchgeführt (50µl, 2µg DHFR-mRNA, 2 h, 25°C) und die DHFR-Aktivität bestimmt. Für die Translationreaktionen wurde immer die gleiche mRNA-Präparation verwendet, um ausschließlich die Abhängigkeit der Translationsaktivität der lyophilisierten Reaktionsgemische von der Lagertemperatur und Zeit zu bestimmen.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabiler Reaktionsgemische dadurch gekennzeichnet, daß native oder artifizielle enzymatisch aktive Proteingemische mit Reaktionskomponenten und einem Stabilisierungsmittel, welches einerseits die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Systems erhöht und welches andererseits instabile Reaktionskomponenten vor dem Verlust ihrer biologischen Aktivität bzw. ihrer biologisch aktiven Struktur während der Lagerstabilmachung und Lagerung schützt, in wäßriger Lösung kombiniert werden und anschließend durch Gefriertrocknung in einen bei 0°-10°C lagerstabilen Zustand überführt werden, wobei die Menge des Stabilisierungsmittels, die zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität des Reaktionsgemisches führt, equivalent zu der Menge ist, die für die Lagerstabilmachung des komplexen multienzymatischen Reaktionsgemisches benötigt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als native enzymatisch aktive Proteingemische Zellextrakte, Zellysate oder Fraktionen aus diesen einsetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als artifizielle enzymatisch aktive Proteingemische eine Kombination aus vorgereinigten Einzelenzymen, Cofaktoren und gegebenenfalls Strukturproteinen einsetzt, die gegebenenfalls verschiedener Herkunft sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reaktionskomponenten enzymatische und nichtenzymatische Kofaktoren, Enzymsubstrate, Nukleotide und Nukleoside oder deren Oligomere, Proteine, Peptide, Thiolverbindungen, RNS, DNS und gegebenenfalls Derivate jeder der obigen Substanzen einzeln oder in Kombination einsetzt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Stabilisierungsmittel ein Zucker ist, mit einer Konzentration von 8-12% (M/Vol) in wäßriger Lösung ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Zucker Trehalose ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vakuumtrocknung der multienzymatischen Reaktionsgemische bei Raumtemperatur in einer handelsüblichen Lyophilisationsanlage in einer Zeitspanne von 3-4 Stunden durchgeführt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktionsgemische unmittelbar vor der Vakuumtrocknung in flüssigem Stickstoff oder gegebenenfalls in einem Trockeneis/Alkoholbad eingefroren werden.

9. Verwendung der komplexen multienzymatischen lagerstabilen Reaktionsgemische nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden oder Nukleinsäuren nach Rekonstitution in Wasser, wobei jeweils eine oder mehrere spezifische Schlüsselkomponenten hinzugegeben werden.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schlüsselkomponenten radioaktiv- bzw. nichtradioaktiv-markierte Aminosäuren oder deren entsprechende aminoacylierten tRNS-Moleküle, radioaktiv- bzw. nichtradioaktiv-markierte Nukleotide oder gegebenenfalls deren Derivate oder Oligomere, natürliche oder artifizielle Boten-RNS, DNS verschiedenen Ursprungs oder Kombinationen aus den obigen Substanzen sind.

11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10 für die zellfreie ribosomale Proteinbiosynthese und gegebenenfalls für die posttranskriptionale Modifikation von Peptiden, Polypeptiden und Proteinen.

12. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10 für die Replikation, reverse oder nichtreverse Transkription, gegebenenfalls nach Anreicherung oder Modifizierung von Nukleinsäuren *in-vitro*.

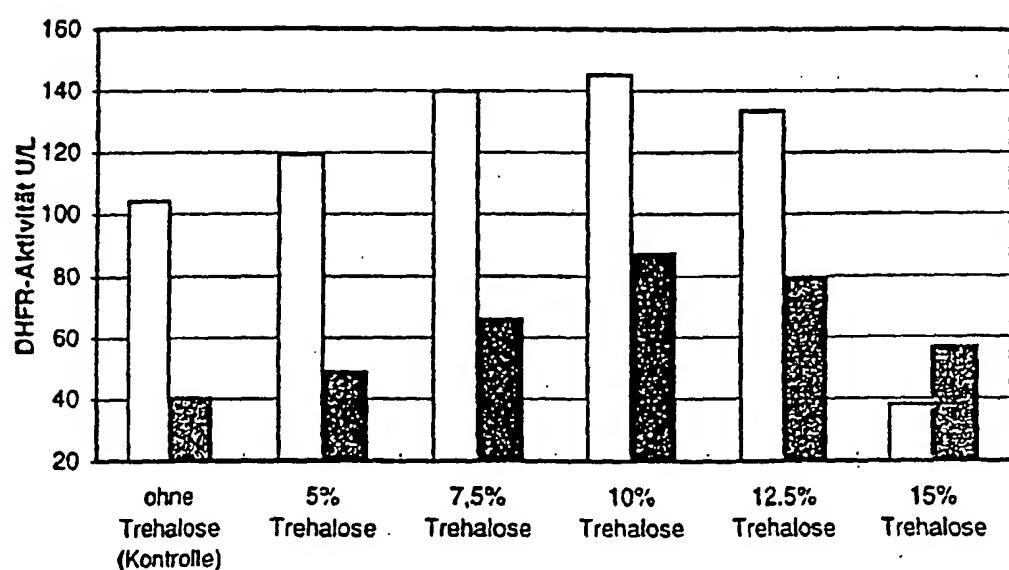


Abb. 1

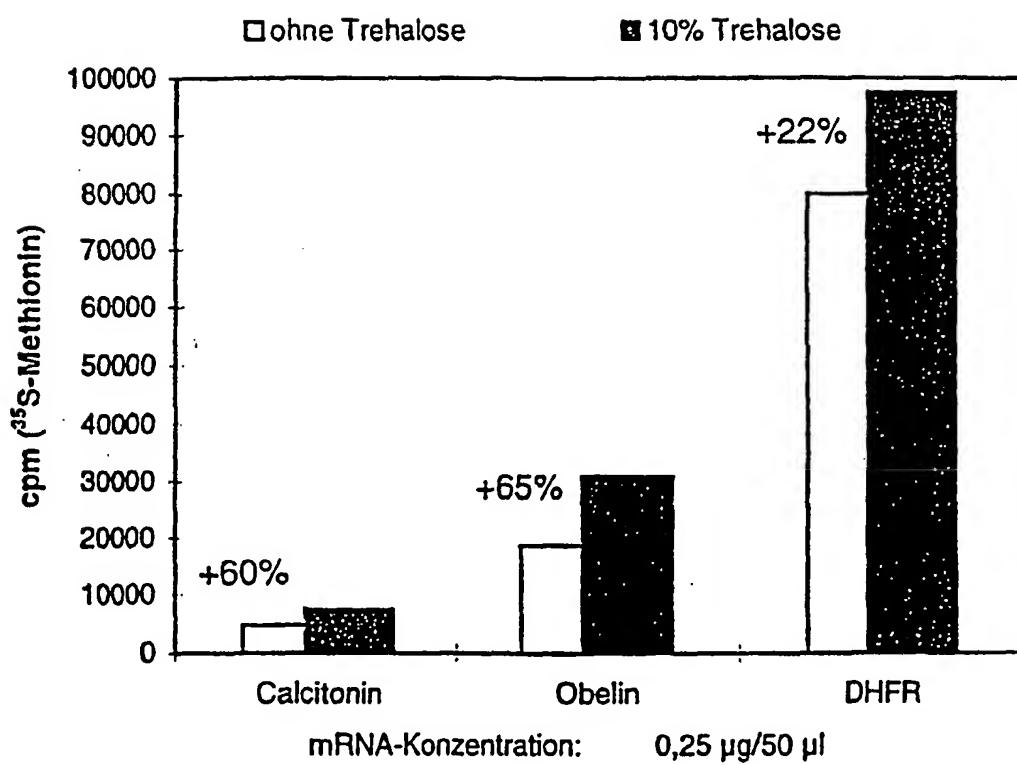


Abb. 2a

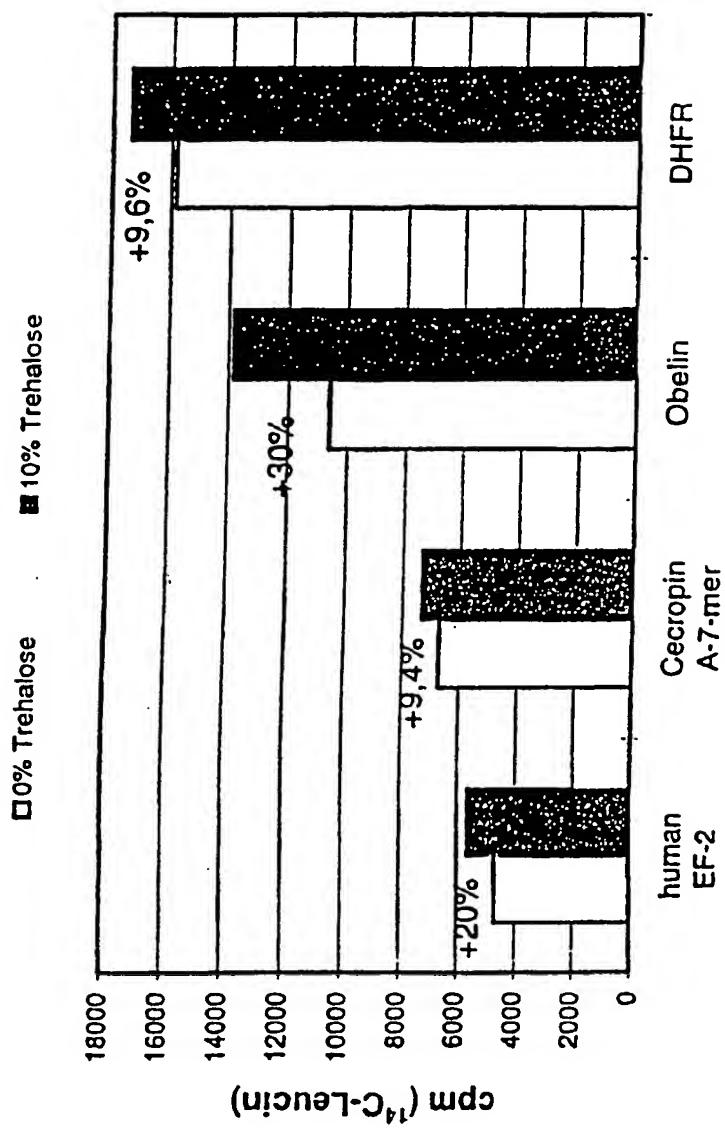


Abb. 2b)

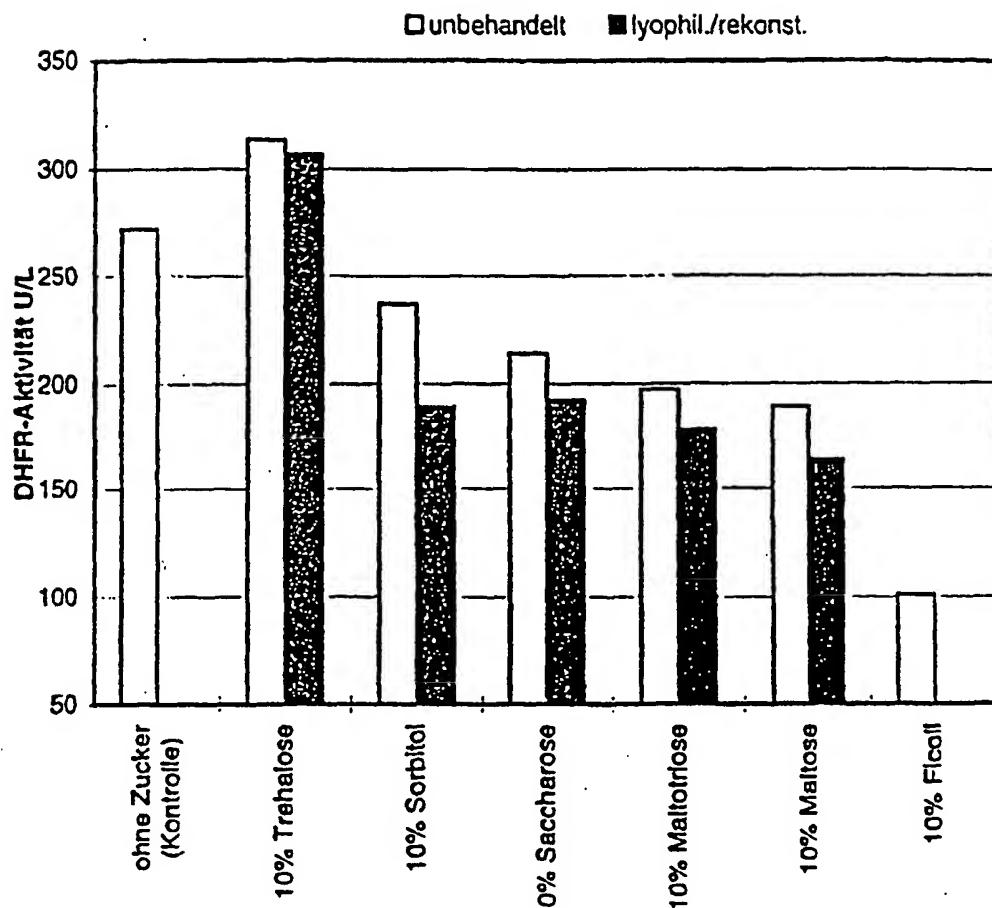


Abb. 3

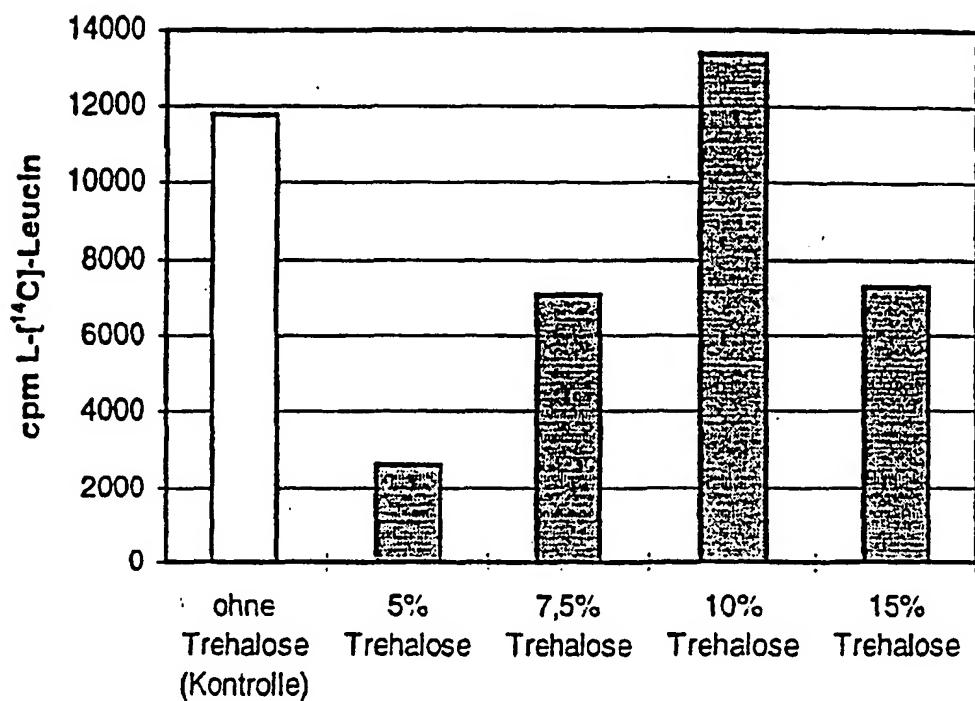
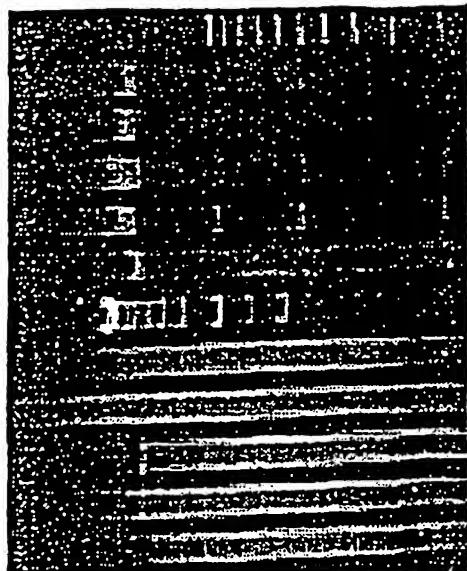


Abb. 4

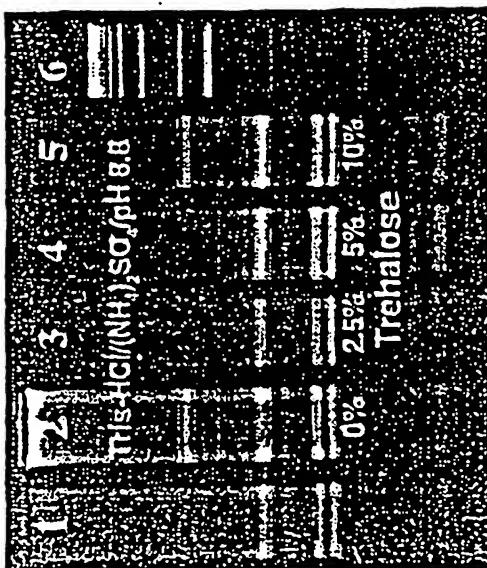
6/7



5C



5B



5A

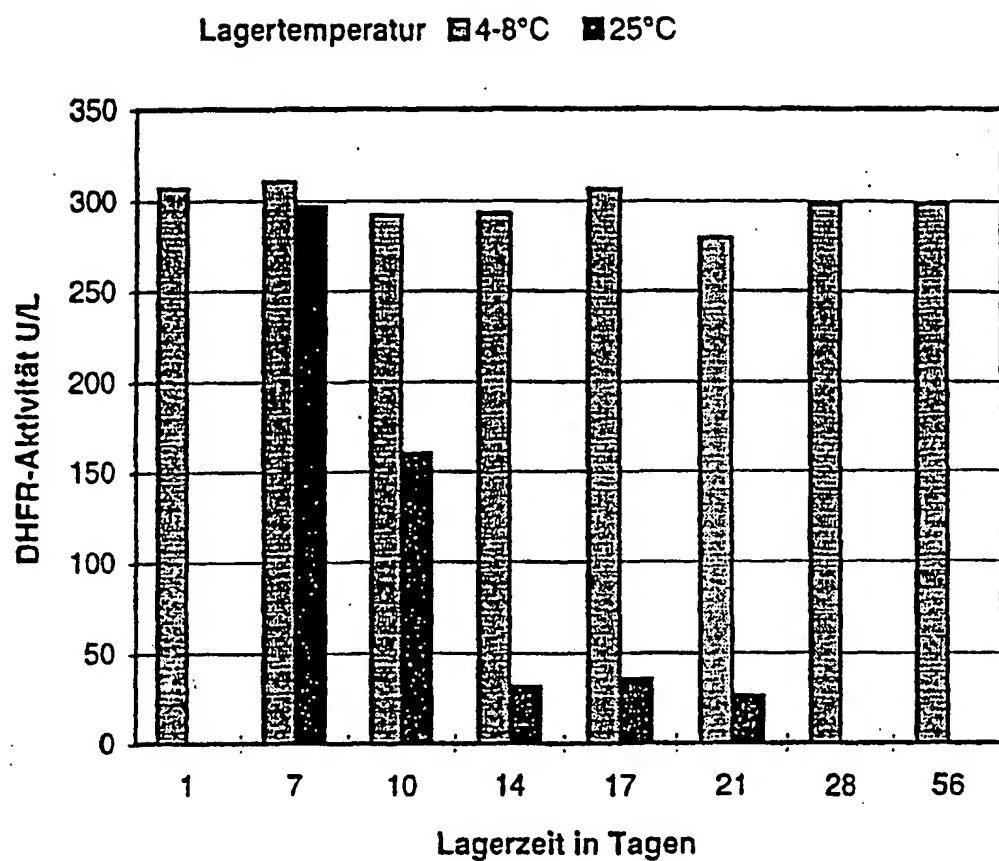


Abb. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PLT/DE 96/01288

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|-----------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | | | | |
| IPC 6 C12N9/96 C12Q1/25 C12Q1/48 C12Q1/68 C12P21/02 //G01N33/573 | | | | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | | | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12Q C12P G01N | | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | | | | Relevant to claim No. |
| X | BIOTECHNOLOGY, vol. 10, 10 September 1992, pages 1007-1011, XP000568746 COLACO ET AL.: "Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology." siehe das ganze Dokument, besonders Discussion | | | | 1-10,12 |
| A | | | | | 11 |
| A | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 21, no. 12, 1993, pages 2959-2960, XP002027157 KAIJALAINEN S. ET AL. : "An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose." see the whole document --- --- -/-/ | | | | 1-12 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | | | | |
| * Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'D' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | | | |
| *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents such combination being obvious to a person skilled in the art. *A* document member of the same patent family | | | | | |
| 2 | Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report | | |
| | 12 March 1997 | | 19.03.97 | | |
| Name and mailing address of the ISA | | | Authorized officer | | |
| European Patent Office, P.B. 5018 Patendaan 2 NL - 2200 RIV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+ 31-70) 340-3016 | | | Mandl, B | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

for National Application No
PCT/DE 96/01288

| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|--|-----------------------|
| Category | Criterion of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | EP 0 365 685 A (TORAY INDUSTRIES) 2 May 1990 see the whole document --- | 1-12 |
| A | PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 91, June 1994, pages 5695-5699, XP002027158 CHENG S. ET AL. : "Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA." see page 5697, left-hand column, paragraph 3 --- | 1-10,12 |
| E | DE 195 03 685 A (INVITEK GMBH) 1 August 1996 see the whole document --- | 1-12 |
| E | EP 0 726 310 A (GEN PROBE INC) 14 August 1996 see the whole document ----- | 1-10,12 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| | |
|------------------------------|--|
| International Application No | |
| PLI/DE 96/01288 | |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|---|--|
| EP 0365685 A | 02-05-90 | DE 68920693 D DE 68920693 T AT 117434 T WO 8909402 A US 5262296 A | 02-03-95 24-05-95 15-02-95 05-10-89 16-11-93 |
| DE 19503685 A | 01-08-96 | NONE | |
| EP 0726310 A | 14-08-96 | US 5556771 A AU 4916796 A WO 9624664 A | 17-09-96 27-08-96 15-08-96 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inv. nationales Aktenzeichen
PLI/DE 96/01288

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N9/96 C12Q1/25 C12Q1/48 C12Q1/68 C12P21/02
//G01N33/573

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK.

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 6 C12N C12Q C12P G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|--------------------|
| X | BIOTECHNOLOGY, Bd. 10, 10. September 1992, Seiten 1007-1011, XP000568746 COLACO ET AL.: "Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology." siehe das ganze Dokument, besonders Discussion | 1-10,12 |
| A | --- | 11 |
| A | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 21, Nr. 12, 1993, Seiten 2959-2960, XP002027157 KAIJALAINEN S. ET AL. : "An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose." siehe das ganze Dokument --- | 1-12 |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *' A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere Bedeutung anzusehen ist
- *' E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *' L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie aufgeführt)
- *' O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *' P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *' T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundekiegenden Prinzipie oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *' X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *' Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *' &' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

| | |
|---|---|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Abgededatum des internationalen Rechercheberichts |
| 12.März 1997 | 19.03.97 |
| Name und Postanschrift der internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 3818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epu nl. Fax (+ 31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Mandl, B |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inv. Sonales Aktenzeichen
PLI/DE 96/01288

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| A | EP 0 365 685 A (TORAY INDUSTRIES) 2.Mai 1990 siehe das ganze Dokument --- | 1-12 |
| A | PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 91, Juni 1994, Seiten 5695-5699, XP002027158 CHENG S. ET AL. : "Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA." siehe Seite 5697, linke Spalte, Absatz 3 --- | 1-10,12 |
| E | DE 195 03 685 A (INVITEK GMBH) 1.August 1996 siehe das ganze Dokument --- | 1-12 |
| E | EP 0 726 310 A (GEN PROBE INC) 14.August 1996 siehe das ganze Dokument ----- | 1-10,12 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

| | |
|-----------------|-------------------------|
| Inv. | nationales Aktenzeichen |
| PLI/DE 96/01288 | |

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|---|--|
| EP 0365685 A | 02-05-90 | DE 68920693 D DE 68920693 T AT 117434 T WO 8909402 A US 5262296 A | 02-03-95 24-05-95 15-02-95 05-10-89 16-11-93 |
| DE 19503685 A | 01-08-96 | KEINE | |
| EP 0726310 A | 14-08-96 | US 5556771 A AU 4916796 A WO 9624664 A | 17-09-96 27-08-96 15-08-96 |